

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problems Mailbox.**

STIC-ILL

8637147

NO

418640

From: Holleran, Anne  
Sent: Wednesday, October 30, 2002 3:48 PM  
To: STIC-ILL  
Subject: refs. for 09/835,759

Please send copies of the following papers:

1. Keith, Cancer Immunology, Immunotherapy (2002) 51(10): 521-531
2. Mian Immunology and Medicine Series (2001) 30(Cancer Immunolgy ), 1-26
3. Timmerman J. Immunology (2000) 164(9): 4797-4803
4. Santin J. Virology (2000) 74(10): 4729-4737
5. Tanigawa J. Immunotherapy (2000) 23(5): 528-535
6. Flieger Hybridoma (1999) 18(1): 63-68
7. Sandmaier J. Immunotherapy (1999) 22(1): 54-66
8. Reinartz Hybridoma (1999) 18(1): 41-45
9. Lofthouse Vaccine (1997) 15(14): 1586-1593
10. Haagen Leukemia and Lymphoma (1995) 19(5-6): 381-393
11. Reddish Onkologie (1995) 18(suppl 1): 33-35
12. Apostolopoulos Cancer Res. (1994) 54(19): 5186-5193

Scientific and Technical  
Information Center

NOV 01 RECD

PAT. & T.M. OFFICE

COMPLETED

0378-584x

Anne Holleran  
AU: 1642  
Tel: 308-8892  
RM: 8e03

mailbox: 8e12

M. A. Reddish  
V. Buszynski  
L. Dine  
B. M. Longenecker

Edmonton, Canada

## Active Specific Immunotherapy of Adenocarcinomas with Synthetic Tumor-Associated Antigens Conjugated to Keyhole Limpet Hemocyanin

### Key Words

Keyhole limpet hemocyanin  
DTH response, hapten-specific  
TH1 immune response  
TH2 immune response  
T-cell proliferative activity  
KLH conjugates

### Summary

We have been conducting phase II clinical trials for the treatment of various adenocarcinomas with synthetic carbohydrate epitope vaccines that utilized Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) as a carrier protein. To date, over 180 patients have been enrolled into these immunotherapy studies with the sialyl-Tn antigen conjugated to KLH. Objective tumor responses have been observed in these trials in both breast and ovarian cancer patients. The phase II studies have been designed to answer key questions towards optimizing the immunotherapeutic effects. The first question was to determine the optimal route (oral vs. intravenous) of low-dose cyclophosphamide that is used to overcome a state of tumor-induced immunosuppression. The antibody titer data from this study show a statistically significant increase in anti-STn IgG antibodies in the IV group. The second key question has been the optimal dose of antigen to use for the generation of a therapeutically beneficial immune response. This is in light of recent observations that low doses of antigens may favor a TH1 (cellular) immune response as opposed to a TH2 (antibody-based) immune response. We have shown that low doses (1 µg) of Theratope® STn-KLH vaccine but not high doses (25 µg) will induce a hapten-specific DTH response in CAF1 mice. In addition, a low dose of vaccine will cause greater T-cell proliferative activity in a popliteal lymph node cell population after footpad challenge. The supernatants of these antigen-stimulated cultures do indeed contain gamma-interferon in a relative absence of IL-10, thus confirming the TH1 nature of this response. We have investigated this low-dose T-cell response with other KLH conjugates and with KLH itself and this observation is consistent. Thus KLH conjugates, although frequently employed for optimizing an antibody response to T-cell-independent antigens, are capable of inducing TH1 immune responses, and do so optimally at lower doses. These effects are optimally seen with certain adjuvant formulations (DETOX™-B, RIBI Immunochem).

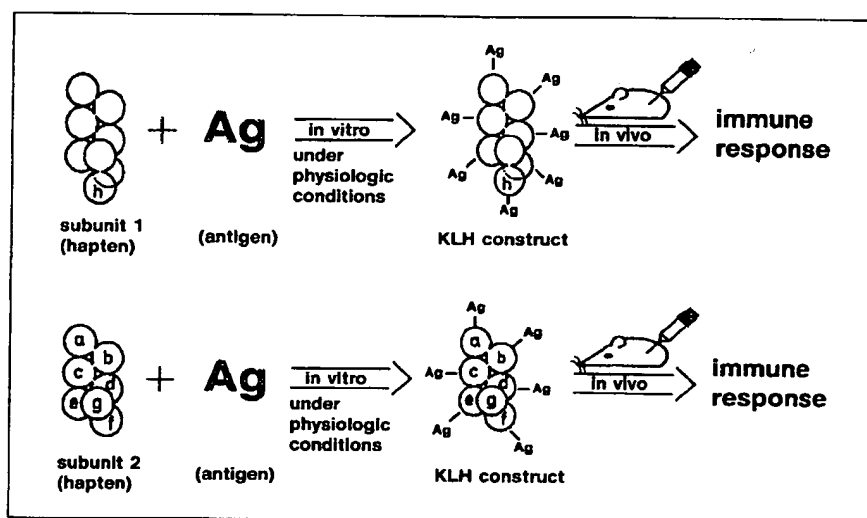
As a part of the immunologic monitoring of our ASI patients, we have performed in vitro antigen stimulations for hapten-specific blastogenesis and cytokine profiles. The data suggest that a TH1 immune response as measured by gamma-interferon production (without IL-10 production) is associated with disease stability and/or partial responses. These are the immunologic parameters by which the current dose range studies are being evaluated for the selection of an optimal therapeutic dose of Theratope® STn-KLH.

Dr. M. A. Reddish  
BIOMIRA Inc.  
Edmonton Research Park  
2011-94 Street  
Edmonton, Alberta, T6N 1H1 (Canada)

© 1995 S. Karger GmbH,  
Freiburg

**Table 1.** KLH as a carrier molecule

Antigen (Ag)		Physiological response to the KLH construct
chemical identity	functional identity	
<ul style="list-style-type: none"> <li>- peptides</li> <li>- proteins</li> <li>- glycopeptides</li> <li>- glycoproteins</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- tumor-specific antigens</li> <li>- cytokines</li> <li>- vaccines</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- antitumor response</li> <li>- suppression of cytokine synthesis</li> <li>- vaccination</li> <li>- antiallergic effect</li> <li>- production of monoclonal antibodies</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- carbohydrates (mono-, oligo-, polysaccharides)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- vaccines</li> <li>- allergens</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- vaccination</li> <li>- antiallergic effect</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- chemical compounds</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- allergens</li> <li>- hormones</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- antiallergic effect</li> <li>- antihormone effect</li> </ul>



**Fig. 1.** KLH-antigen reaction.

### Schlüsselwörter

Keyhole Limpet Hämocyanin  
DTH-Antwort, Hapten-spezifische  
TH1-Immunantwort  
TH2-Immunantwort  
T-Zell-Immunantwort  
KLH-Konjugate

### Zusammenfassung

Wir führen klinische Phase-II-Studien zur Behandlung verschiedener Adenokarzinome mit synthetischen Kohlenhydrat-Epitop-Vakzinen durch, die Keyhole Limpet Hämocyanin (KLH) als Trägerprotein verwendeten. Bis heute sind mehr als 180 Patienten in diese Studien zur Immuntherapie mit dem an KLH gekoppelten Sialyl-Tn-Antigen aufgenommen worden. In diesen Studien wurde sowohl beim Mamma- als auch beim Ovarialkarzinom eine objektive Tumor-Response beobachtet. Diese Phase-II-Studien sollen Schlüsselfragen für die Optimierung immuntherapeutischer Effekte beantworten. Die erste Frage war die nach dem optimalen Verabreichungsweg (oral oder intravenös) von niedrigdosiertem Cyclophosphamid, das zur Überwindung einer Tumor-induzierten Immunsuppression eingesetzt wird. Die Antikörpertiter-Daten aus dieser Studie zeigen einen statistisch signifikanten Anstieg der Anti-STn-IgG-Antikörper in der i. v.-Gruppe. Die zweite Frage war die nach der optimalen Antigendosis zur Erzeugung einer therapeutisch vorteilhaften Immunantwort. Dies stützt sich auf neueste Erkenntnisse, daß niedrige Antigendosen wohl eine TH1-Immunantwort (zellulär) statt einer TH2-Immunantwort (auf Antikörpern basierend) begünstigen. Wir konnten zeigen, daß niedrige Dosen (1 µg) der

Theratope®-STn-KLH-Vakzine – jedoch nicht hohe Dosen (25 µg) – eine Hapten-spezifische DTH-Antwort in CAF1-Mäusen auslösen. Außerdem verursacht eine niedrige Vakzindosis nach einer Reizung des Fußballens eine höhere Proliferationsaktivität der T-Zellen in einer Zellpopulation des poplitealen Lymphknotens. Die Überstände dieser Antigen-stimulierten Kulturen enthalten in der Tat Interferon-γ bei relativer Abwesenheit von IL-10, was bestätigt, daß es sich um eine TH1-Immunantwort handelt. Wir untersuchten die T-Zell-Immunantwort nach Anwendung von anderen niedrigdosierten KLH-Konjugaten sowie von KLH selbst und fanden diese Beobachtung bestätigt. Obwohl KLH-Konjugate häufig dazu verwendet werden, eine Antikörper-Response auf T-Zell-unabhängige Antigene zu optimieren, können sie also TH1-Immunantworten induzieren, wobei eine optimale Antwort durch niedrige Dosen erzielt wird. Diese Effekte können mit bestimmten Adjuvanzen (DE-TOX™-B, RIBI Immunochem) optimal hervorgerufen werden.

Als Teil des Immunmonitorings unserer ASI-Patienten führten wir in vitro Antigen-Stimulierungen für die Hapten-spezifische Blastogenese und Zytokinprofile durch. Die Ergebnisse deuten an, daß eine TH1-Immunantwort – gemessen durch die Interferon-γ-Produktion (ohne IL-10-Produktion) – mit der Stabilität der Krankheit und/oder mit einer Teil-Response zusammenhängt. Dies sind die Immunparameter, mit denen die derzeit laufenden Dosisfindungsstudien zur Bestimmung einer optimalen therapeutischen Dosis von Theratope®-STn-KLH ausgewertet werden.